12.14.3 Rendimiento de la biomasa

El rendimiento observado del producto a partir de la biomasa Y^{r}_{PX} se define en la Ecuación (12.109). Cuando la síntesis del producto está directamente acoplada al metabolismo energético, r_P viene dada por la Ecuación (12.100). Sustituyendo esto y la Ecuación (12.80) en la Ecuación (12.109) se obtiene:

$$Y PX^{r} 5 \; Y_{PX} \; 1 \; \frac{m_P}{\mu} \qquad (12.113)$$

El grado de desviación de Y^{r}_{PX} con respecto a Y_{PX} depende de las magnitudes relativas de m_P y μ. Para aumentar el rendimiento observado del producto para un proceso concreto, debe aumentarse m_P y disminuirse μ. La ecuación (12.113) no se aplica a los productos no acoplados directamente a
metabolismo energético; no disponemos de una expresión general para r_P en términos del verdadero coeficiente de rendimiento para esta clase de producto.

12.14.4 Rendimiento del producto a partir del sustrato

El rendimiento observado del producto a partir del sustrato Y^{r}_{PS} se define en la Ecuación (12.110). Para los productos acoplados a la generación de energía, las expresiones para r_P y r_S están disponibles a partir de las Ecs. (12.100) y (12.104). Por lo tanto:

$$\overset{r}{YPS} \; 5 \; \frac{Y_{PX}\mu \; 1 \; m_P}{\frac{\mu}{YXS} \; 1 \; m_S} \qquad (12.114)$$

En muchas fermentaciones anaerobias, como la producción de etanol, el rendimiento del producto a partir del sustrato es un factor crítico que afecta a la economía del proceso. Con un Y elevado$^{r}_{PS}$, se produce más etanol por masa de carbohidratos consumida y se reduce el coste global de producción.
La tasa de crecimiento tiene un fuerte efecto sobre Y^{r}_{PS} para el etanol. Dado que Y^{r}_{PS} es bajo cuando μ 5 μ_{max} , es deseable reducir la tasa de crecimiento específico de las células. Se pueden conseguir tasas de crecimiento bajas privando a las células de algún nutriente esencial, por ejemplo, una fuente de nitrógeno, o inmovilizando las células para impedir el crecimiento. Como se indica en el capítulo 14, el cultivo continuo ofrece más posibilidades de manipular las tasas de crecimiento que el cultivo por lotes. Aumentar la tasa de actividad de mantenimiento en relación con el crecimiento también mejorará el rendimiento del producto. Esto puede hacerse utilizando un medio de alta fuerza iónica, aumentando la temperatura o seleccionando un mutante u organismo diferente con altos requisitos de mantenimiento.

El efecto de la tasa de crecimiento y el mantenimiento en Y^{r}_{PS} es difícil de determinar para los productos que no están directamente acoplados al metabolismo energético, a menos que se disponga de información sobre el efecto de estos parámetros en q_P .

12.15 CINÉTICA DE LA MUERTE CELULAR

La cinética de la muerte celular es una consideración importante en el diseño de procesos de esterilización y para el análisis de cultivos celulares en los que se espera una pérdida sustancial de viabilidad. En

un entorno letal, las células de una población no mueren todas a la vez; la desactivación del cultivo se produce a lo largo de un periodo de tiempo finito que depende del número inicial de células viables y de la gravedad de las condiciones impuestas. La pérdida de viabilidad celular puede describirse matemáticamente de forma muy similar a la desactivación enzimática (Sección 12.6). La muerte celular se considera como un proceso de primer orden:

$$r_d \; 5 \; k N_d \qquad (12.115)$$

donde r_d es la tasa de muerte celular, N es el número de células viables y k_d es la *constante de muerte específica*. Alternativamente, la tasa de muerte celular puede expresarse en términos de concentración celular en lugar de en número de células:

$$r_d \; 5 \; k x_d \qquad (12.116)$$

donde k_d es la constante de muerte específica en función de la concentración celular y x es la concentración de células viables.

En un sistema cerrado donde la muerte celular es el único proceso que afecta la concentración de células viables, la tasa de muerte celular es igual a la tasa de disminución del número de células. Por lo tanto, utilizando la Ec. (12.115):

$$r_d \; 5 \frac{2dN}{dt} \; 5 \; k N_d \qquad (12.117)$$

Si k_d es constante, podemos integrar la Ec. (12.117) para obtener una expresión de N *en* función del tiempo:

$$N \; 5 \; N_0 \, e^{2k_d t} \qquad (12.118)$$

donde N_0 es el número de células viables en el momento cero. Tomando logaritmos naturales de ambos lados de la Ec. (12.118) se obtiene:

$$\ln N \; 5 \; \ln N_0 \; 2 \; k t_d \qquad (12.119)$$

De acuerdo con la Ecuación (12.119), si se aplica la cinética de muerte de primer orden, una gráfica de ln N contra t da una línea recta con pendiente *2*k_d . Las mediciones experimentales han confirmado la relación de la Ecuación (12.119) para muchos organismos en estado vegetativo; como ejemplo, en la Figura 12.21 se muestran los resultados de la muerte térmica de *Escherichia coli* a varias temperaturas. Sin embargo, la cinética de muerte de primer orden no siempre se mantiene, en particular para las esporas bacterianas inmediatamente después de la exposición al calor.

Al igual que otras constantes cinéticas, el valor de la constante de muerte específica k_d depende de la temperatura. Este efecto puede describirse mediante la relación de Arrhenius de la Ec. (12.74). Los valores típicos de E_d para la destrucción térmica de microorganismos son altos, del orden de 250 a 290 kJ $gmol^{21}$ [23]. Por lo tanto, pequeños aumentos de temperatura tienen un efecto significativo sobre k_d y la tasa de muerte celular.

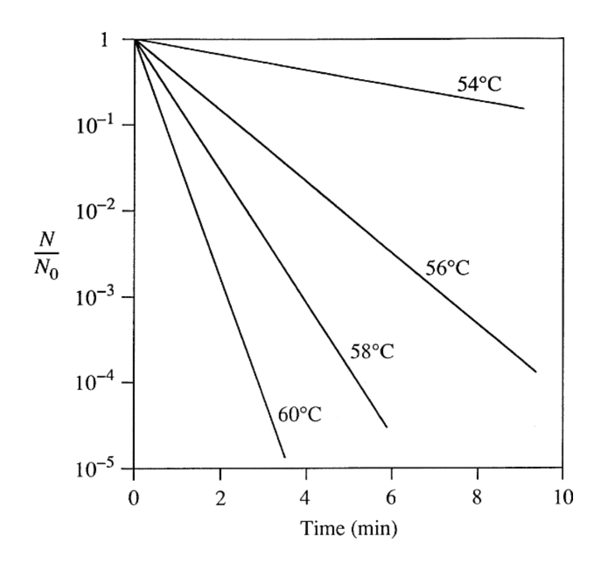


FIGURA 12.21 Relación entre la temperatura y la tasa de muerte térmica para células vegetativas *de Escherichia coli*.
De S. Aiba, A.E. Humphrey y N.F. Millis, 1965, Biochemical Engineering*, Academic Press, Nueva York.*

EJEMPLO 12.9 CINÉTICA DE MUERTE TÉRMICA

Se mide el número de esporas viables de una nueva cepa de *Bacillus subtilis* en función del tiempo a distintas temperaturas.

Tiempo (min)	Número de esporas en: T 5 85 C°	T 5 90 C°	T 5 110 C°	T 5 120 C°
0.0	2.40 3 10^9	2.40 3 10^9	2.40 3 10^9	2.40 3 10^9
0.5	2.39 3 10^9	2.38 3 10^9	1.08 3 10^9	2.05 3 10^7
1.0	2,33 3 10^9	2,29 3 10^9	4.80 3 10^8	1.75 3 10^5
1.5	2,37 3 10^9	2,21 3	2.20 3 10	1.30 3 10
2.0	2,32 3 10^9	2.30 3 10^9	9.85 3 10^7	-
3.0	2,28 3 10^9	2,17 3	2.01 3 10^7	-
4.0	2,20 3 10^9	2,12 3	4.41 3 10^6	-
6.0	2,19 3 10^9	1,95 3	1.62 3 10^5	-
8.0	2,16 3 10^9	1,87 3	6.88 3 10^3	-
9.0		1,79 3	-	-

(a) Determinar la energía de activación para la muerte térmica de las esporas de *B. subtilis*.
(b) ¿Cuál es la constante de muerte específica a 100° C?
(c) Calcule el tiempo necesario para matar el 99% de las esporas de una muestra a 100 C.°

Solución

(a) En la Figura 12.22 se muestra un gráfico semilogarítmico del número de esporas viables en función del tiempo para cada una de las cuatro temperaturas. A partir de la Ecuación (12.119), las pendientes de las rectas de la Figura 12.22 son iguales a $2k_d$ a las distintas temperaturas. El ajuste de las rectas a los datos da los siguientes resultados:

k_d (85° C) 5 0,012 min21 k_d (90° C) 5 0,032 min21 k_d (110° C) 5 1,60 min21 k_d (120° C) 5 9,61 min21

La relación entre k_d y la temperatura absoluta viene dada por la Ecuación (12.74). Por lo tanto, un diagrama semilogarítmico de k_d frente a 1/T debe dar una línea recta con pendiente $52E_d$ /R donde T es la temperatura absoluta. La temperatura se convierte de grados Celsius a Kelvin utilizando la fórmula de la Ec. (2.27); los resultados para k_d se grafican contra $1/T$ en unidades de K21 en la Figura 12.23. La pendiente es 227.030 K. Del Apéndice B, R 5 8.3144 J K21 gmol21. Por lo tanto:

E_d 5 27 030 K (8,3144 J K21 gmol21) 5 2,25 3 10^5 J gmol21

E_d 5 225 kJ gmol21

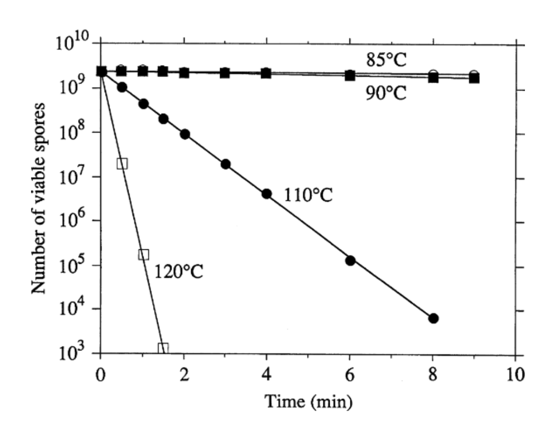


FIGURA 12.22 Muerte térmica del *Bacillus subtilis* esporas.

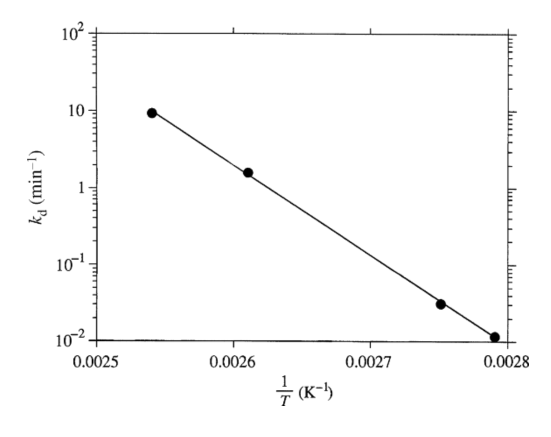


FIGURA 12.23 Cálculo de los parámetros cinéticos para la muerte térmica de las esporas.

(b) La ecuación de la recta de la figura 12.23 es:

$$k_d \, 5 \, 6.52 \, 3 \, 10^{30} e^{\, 227.030/T}$$

donde k_d tiene unidades de min^{21} y T tiene unidades de K. Por lo tanto, a T 5 100° C 5 373,15 K, k_d 5 0,23 min^{21} .

(c) A partir de la Ec. (12.119):

$$t \, 5 \, \frac{2(\ln N \, 2 \, \ln N_0)}{k_d}$$

o

$$t \, 5 \, \frac{2\ln \dfrac{N}{N_0}}{k_d}$$

Para N igual al 1% de N_0 , N/N_0 5 0,01. A 100° C, k_d 5 0,23 min^{21} y el tiempo necesario para matar el 99% de las esporas es:

$$t \, 5 \, \frac{2\ln (0{,}01)}{0{,}23 \ min^{21}} \, 5 \, 20 \ min$$

Cuando los organismos contaminantes de los medios de cultivo se eliminan mediante esterilización por calor, los nutrientes del medio también pueden destruirse. La sensibilidad de las moléculas de nutrientes a la temperatura se describe mediante la ecuación de Arrhenius de la Ec. (12.74). Los valores de la energía de activación E_d para la destrucción térmica de vitaminas y aminoácidos son de 84 a 92 kJ $gmol^{21}$; para las proteínas, E_d es de unos 165 kJ $gmol^{21}$ [23]. Dado que estos valores son algo inferiores a los valores típicos *de* E_d para la muerte térmica de microorganismos, el aumento de la temperatura tiene un mayor efecto sobre la muerte celular que sobre la destrucción de nutrientes. Esto significa que la esterilización a temperaturas más altas durante periodos de tiempo más cortos tiene la ventaja de matar las células con una destrucción limitada de los componentes del medio.

12.16 INGENIERÍA METABÓLICA

La ingeniería metabólica se ocupa del comportamiento y las propiedades de las redes de reacción, incluida su estructura, estequiometría, cinética y control. En bioprocesamiento, la ingeniería metabólica se utiliza para rediseñar rutas metabólicas con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos celulares. Comprender el funcionamiento de las redes de reacciones nos permite identificar qué reacciones del metabolismo son las mejores para manipularlas genéticamente con el fin de mejorar las propiedades celulares. Entre las mejoras que pueden conseguirse mediante la ingeniería metabólica se incluyen:

- Mayor rendimiento y productividad de los compuestos sintetizados por las células
- Síntesis de nuevos productos no producidos anteriormente por un organismo concreto
- Mayor resistencia a las condiciones de bioprocesamiento, por ejemplo, tolerancia a la hipoxia.
- Captación y metabolismo de sustratos no asimilados previamente
- Mayor degradación biológica de los contaminantes

Para mejorar el rendimiento de los cultivos en los bioprocesos pueden utilizarse otras estrategias bien establecidas. Entre ellas se incluyen la introducción de cambios operativos en las condiciones de precultivo y biorreactor para optimizar la función celular, la aplicación de programas de mutagénesis aleatoria y mejora de cepas para modificar el fenotipo celular, y el uso de la tecnología del ADN recombinante para expresar nuevos genes en las células, eliminar genes, amplificar la expresión de genes endógenos y modificar la actividad enzimática. Sin embargo, una característica de la ingeniería metabólica que la distingue de estos enfoques alternativos es que se lleva a cabo un análisis detallado de las vías metabólicas responsables de la propiedad celular de interés antes de realizar ningún cambio en el organismo o su entorno. Se ha demostrado que la alteración de pasos individuales de conversión no suele ser eficaz para lograr cambios significativos en el metabolismo. Por ello, la ingeniería metabólica se centra en el funcionamiento de redes metabólicas integradas, más que en una o varias reacciones enzimáticas. Como tal, la ingeniería metabólica es un paso hacia un enfoque de biología de sistemas para el desarrollo de los organismos.

Como ejemplo, considere la red de reacción mostrada en la Figura 12.24. A partir del sustrato A, se forman dos productos principales, J y L. Comercialmente, L es mucho más valioso que J, pero J y L se producen normalmente en cantidades casi iguales. Comercialmente, L es mucho más valioso que J, pero J y L se producen normalmente en cantidades aproximadamente iguales. Así lo indica el grosor aproximadamente igual de las flechas que conducen a ellos en la Figura 12.24(a). Sin un análisis sistémico de la red de reacciones, se decide reducir la producción de J eliminando el gen que codifica la enzima responsable de convertir A en B. Esto se considera una estrategia adecuada, ya que evita el derroche de A en la vía que conduce a J. El resultado de esta manipulación genética se muestra en la Figura 12.24(b). La eliminación de la reacción A–B también impide la reacción B–G. Como indica el grosor alterado de varias de las flechas de reacción en la Figura 12.24(b), la célula ha compensado la pérdida de esta vía directa a J ajustando el rendimiento de otras reacciones de la red. El resultado global es que la producción de L prácticamente no ha cambiado. Este resultado se observa a menudo tras modificaciones de un solo paso en las rutas metabólicas. Es necesario comprender mejor la interconexión y la influencia de las reacciones en toda la red para tomar decisiones más informadas sobre las estrategias de ingeniería genética. Por lo general, para ajustar eficazmente la selectividad y el rendimiento de las rutas metabólicas es necesario modificar varios pasos de la reacción.

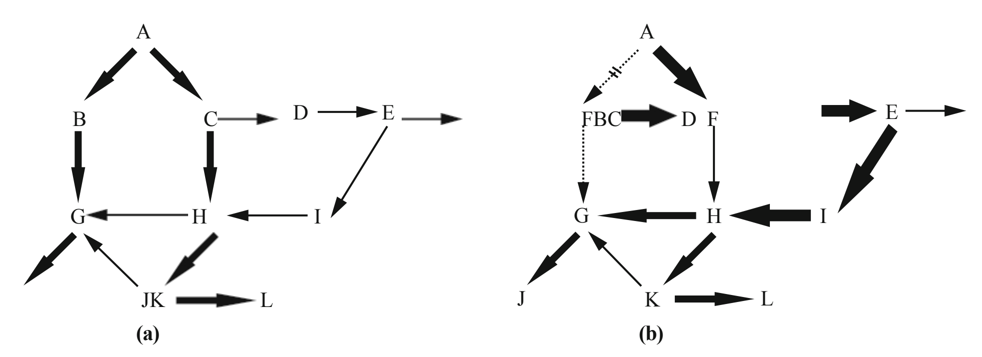


FIGURA 12.24 Red de reacción para la producción de los productos J y L a partir del sustrato A: (a) antes de la

modi- ficación genética de las células, y (b) después de la modificación genética para impedir la conversión de A en B.

La aplicación de la ingeniería metabólica requiere conocimientos de ingeniería y biología. Una vez que las vías se someten a un análisis de ingeniería para identificar las reacciones, las enzimas y los genes diana de la modificación dirigida, se aplican técnicas de biología molecular y ADN recombinante para extraer o amplificar los componentes macromoleculares adecuados. En consonancia con el tema y el ámbito de este libro, aquí nos centraremos principalmente en aquellos aspectos de la ingeniería metabólica que requieren la aplicación de métodos y análisis de ingeniería.

12.16.1 Análisis del flujo metabólico

Sin duda está familiarizado con diagramas de rutas metabólicas como el que se muestra en la Figura 12.25. Este diagrama presenta varias redes de reacciones que operan durante la anaerobiosis.

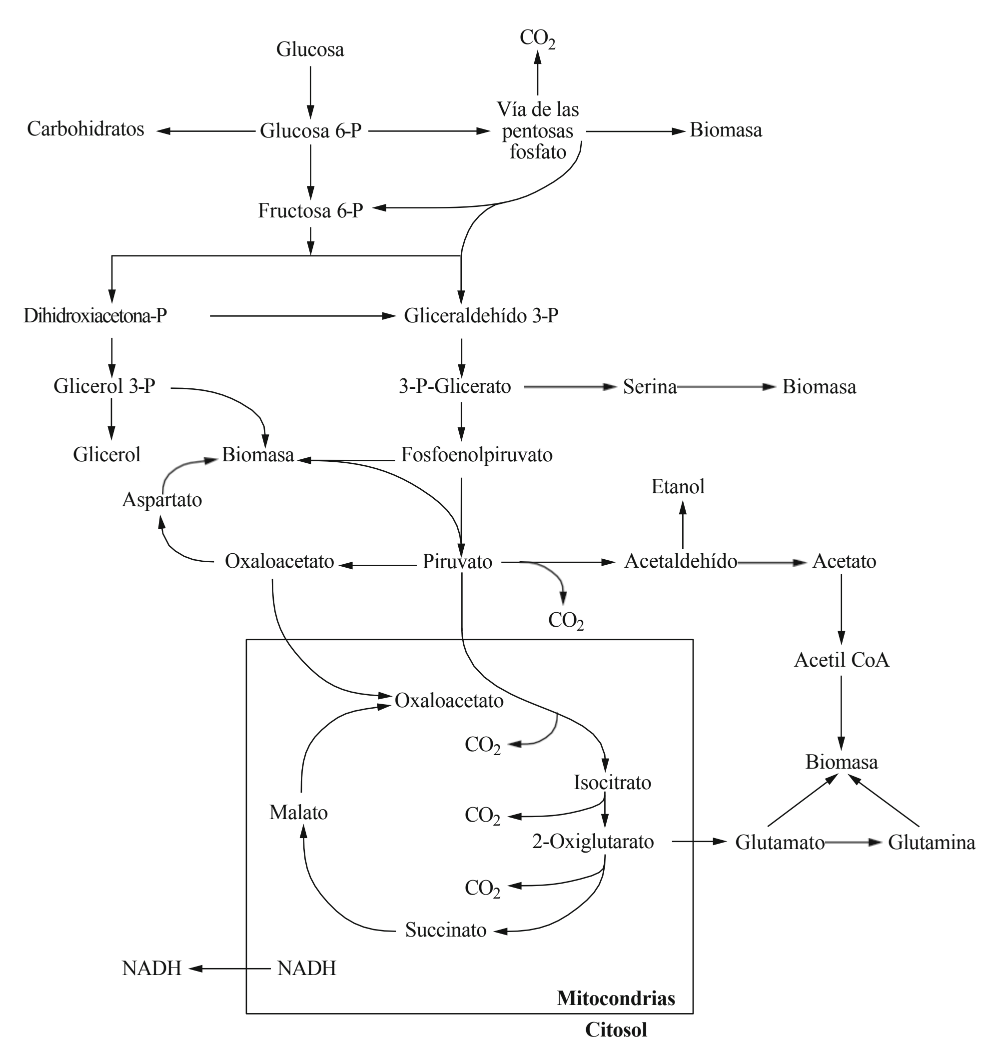


FIGURA 12.25 Vías metabólicas para el crecimiento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*.

crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Los mapas metabólicos contienen mucha información útil sobre los intermediarios formados durante el metabolismo y sus relaciones reactivas entre sí. Sin embargo, no contienen información sobre si determinadas secciones de la vía son más o menos activas en las condiciones reales de cultivo, ni sobre la contribución relativa de los pasos específicos de la reacción al resultado global del metabolismo. Por ejemplo, aunque en la Figura 12.25 se representan las reacciones necesarias para la síntesis de glicerol a partir de glucosa, no está claro si el glicerol es un producto principal o secundario del metabolismo. Otra información sobre el funcionamiento de la red, como el grado en que la síntesis de acetato resta valor a la producción de etanol y la cantidad de material dirigido a la vía de las pentosas fosfato en relación con el procesado por la glucólisis, no está disponible sin una investigación y análisis m á s profundos.

La Figura 12.26 muestra los resultados de un *análisis de flujo metabólico* para *Saccharomyces cerevisiae* cultivado en condiciones anaeróbicas. El término flujo *metabólico* denota la velocidad a la que el mate- rial se procesa a través de una vía metabólica. El flujo en cada rama de la red de reacción se muestra en la Figura 12.26 para un conjunto particular de condiciones de cultivo. Los números en cada paso de conversión indican el flujo de carbono en moles a través de ese paso en relación con un flujo de 100 para la absorción de glucosa en la célula. Un valor negativo para una conversión particular significa que la reacción neta opera en la dirección inversa a la mostrada. La información c u a n t i t a t i v a incluida en la Figura 12.26 refleja la participación relativa de todas las vías principales de la red. Los resultados muestran, por ejemplo, que el glicerol es un producto relativamente menor del metabolismo, ya que el flujo de carbono para la síntesis de glicerol sólo es 9,43/52,76 o el 18% del flujo para la producción de etanol. También se indican otros detalles de interés, por ejemplo que la síntesis de acetato detrae una cantidad insignificante del flujo de carbono hacia el etanol, y que la vía de las pentosas fosfato extrae sólo el 8% del carbono canalizado hacia la glucólisis.

Los mayores beneficios del análisis de flujos metabólicos se obtienen cuando se comparan varios mapas de flujos después de someter los cultivos a perturbaciones ambientales o genéticas. Por ejemplo, una comparación de flujos en condiciones de cultivo que promueven tasas de crecimiento de levadura altas y bajas puede servir para mostrar cómo se redirigen los metabolitos de una región de la vía a otra para adaptarse a la necesidad de una producción de biomasa más rápida. El análisis de flujos también s e utiliza para evaluar las respuestas celulares a nivel molecular a la amplificación o supresión de genes para enzimas específicas en las vías. Los principales puntos de ramificación en las redes de reacción y los efectos de la regulación de enzimas y vías pueden identificarse a partir de análisis de flujo aplicados antes y después de la manipulación genética.

Enfoque global

¿Cómo se evalúan los flujos metabólicos como los que se muestran en la Figura 12.26? Dado que en el análisis de flujos se cuantifican las tasas de las reacciones que ocurren internamente en la célula, es razonable esperar que sea necesaria la medición experimental de los metabolitos intracelulares y las reacciones enzimáticas. Sin embargo, uno de los principales puntos fuertes del análisis de flujos es que no requiere información cinética sobre reacciones individuales ni la medición de concentraciones intermedias para reconstruir las propiedades de la red. En cualquier caso, la complejidad de las redes metabólicas, la dificultad de medir los niveles de metabolitos y los parámetros cinéticos de las enzimas in vivo, y nuestro conocimiento incompleto de las secuencias de reacciones y de las enzimas implicadas en algunas áreas del metabolismo, hacen que este enfoque sea

imposible o imposible.

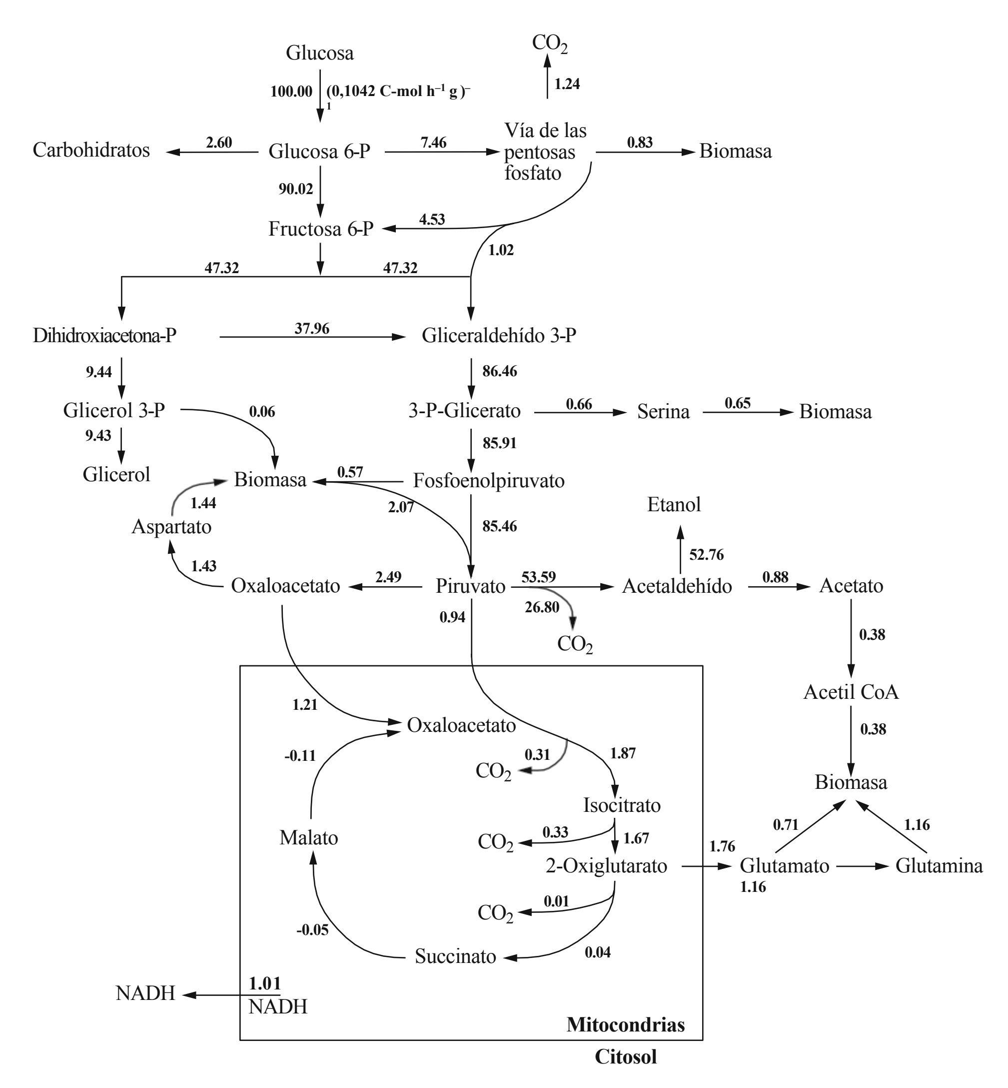


FIGURA 12.26 Vías metabólicas para el crecimiento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae* que muestran los flujos de carbono en ramas individuales de la vía en relación con un flujo de 100 para la absorción de glucosa en la célula. La tasa específica de absorción de glucosa fue de 0,1042 C-mol h^{21} por g de biomasa.
De T.L. Nissen, U. Schulze, J. Nielsen, y J. Villadsen, 1997, Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of Saccharomyces cerevisiae. Microbiology *143,* 203-218. *Copyright 1997. Reproducido con permiso de la Sociedad de Microbiología General.*

muy oneroso en la práctica. En cambio, en el análisis de flujos, se utiliza un número limitado de mediciones experimentales, que podrían incluir el consumo de sustrato, la formación de productos y la composición de la biomasa, junto con un análisis estequiométrico simplificado de las vías para determinar las velocidades de reacción internas. En esencia, los sistemas de reacción altamente complejos, no lineales e intrincadamente regulados se reducen a un conjunto de ecuaciones algebraicas lineales que pueden resolverse con relativa facilidad.

Los métodos empleados en el análisis del flujo metabólico se basan en los introducidos en el Capítulo 4 para evaluar la estequiometría del crecimiento celular y la síntesis de productos. Aquí, ampliamos la descripción macroscópica del metabolismo celular desarrollada en la Sección 4.6 para incluir reacciones que ocurren totalmente dentro de la célula. Dado que las reacciones intracelulares vinculan el consumo de sustrato a la producción de biomasa y productos extracelulares, la determinación de sus flujos permite comprender cómo se consigue el resultado global del metabolismo. En las Secciones 12.10 y 12.11, empleamos la noción de que las tasas de diferentes procesos, como el consumo de sustrato y la formación de productos, podían relacionarse utilizando coeficientes de rendimiento apropiados. Como los coeficientes de rendimiento molar y los coeficientes estequiométricos son, conceptualmente, la misma cosa (Secciones 4.6.3 y 4.6.4), se deduce que las velocidades de reacción individuales en una red pueden relacionarse usando coeficientes estequiométricos. Utilizaremos estas ideas en las secciones siguientes.

Los pasos clave del análisis de flujos metabólicos son la construcción de un modelo de red de reacciones para las rutas metabólicas de interés y la aplicación de restricciones estequiométricas y de equilibrio de masas y de datos experimentales para evaluar los flujos intracelulares. El análisis de flujos se basa en varios principios fundamentales.

- *Balances de masa y carbono*. En general, el análisis de flujos se refiere al flujo de carbono dentro de las rutas metabólicas. Los balances de masa en metabolitos intracelulares muestran cómo se distribuye el carbono aportado en el sustrato entre las diferentes ramas y reacciones de la ruta. Como el modelo de red desarrollado para el análisis de flujo debe satisfacer la ley de conservación de la masa, ésta se conserva en todo el sistema y en cada paso de la reacción.
- *Equilibrio energético químico*. Las reacciones metabólicas generan y consumen energía química a través de la interconversión de ATP, ADP, AMP y compuestos similares. El análisis del flujo metabólico puede llevarse a cabo utilizando únicamente el balance de masas; sin embargo, cuando se incluyen portadores de energía en el modelo, la cantidad de energía generada en una sección de la red metabólica debe ser igual a la cantidad consumida en otras reacciones.
- *Equilibrio redox*. Los portadores redox como el NADH, el NADPH y el $FADH_2$ participan en muchas reacciones celulares. Cuando los portadores redox se incluyen en los cálculos de flujo, el redox generado en una parte de la red de reacción debe consumirse en el resto de la red.
- *Termodinámica de las reacciones*. Las reacciones en el modelo de flujo deben ser termodinámicamente viables. Por ejemplo, si los resultados del análisis de flujo muestran un flujo inverso a través de un paso de reacción irreversible, se han violado importantes principios termodinámicos. Tal resultado indica un error en el análisis.

Definición y simplificación de redes

En el metabolismo celular intervienen miles de reacciones individuales. Definir la red de reacciones que deben incluirse en el análisis del flujo metabólico es, por tanto, una tarea de gran envergadura. Se requiere un conocimiento previo sustancial sobre la estructura de las vías, los componentes implicados y los vínculos entre las subredes metabólicas. Dado que el análisis del flujo se basa en el equilibrio del carbono, el destino de todos los átomos de C debe definirse en el modelo metabólico. Si existen lagunas en la red de reacciones que

impliquen fuentes o sumideros desconocidos de

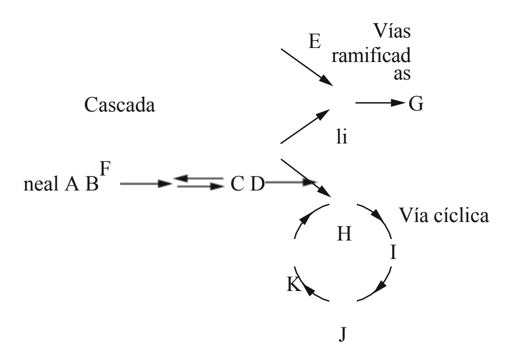


FIGURA 12.27 Tipos de secuencia de reacción en las vías metabólicas.

carbono, los resultados obtenidos del análisis de flujos serán incoherentes con el comportamiento de los cultivos celulares reales y, por tanto, de escaso valor.

La mayoría de las vías bioquímicas contienen ambigüedades que deben resolverse al desarrollar un modelo de red. Por ejemplo, puede haber varias vías alternativas para la asimilación de algunos sustratos y la síntesis de determinados intermediarios; también pueden requerir consideración las contribuciones de diferentes isoenzimas y los efectos de la compartimentación de la reacción. Una vez identificadas las rutas metabólicas de interés, el siguiente paso consiste en simular la red de reacciones para obtener un conjunto de ecuaciones manejable. Para ello, se eliminan algunos intermediarios y se pueden agrupar subredes complejas para agilizar el análisis.

En las rutas metabólicas se encuentran comúnmente tres tipos de secuencia de reacción. Como se muestra en la Figura 12.27, las reacciones metabólicas ocurren en cascadas *lineales*, vías *ramificadas* o *divididas* y vías *cíclicas*. En las secuencias lineales, el producto de una reacción sirve como reactivo para la reacción siguiente y no tienen lugar reacciones alternativas o adicionales. Las vías ramificadas pueden ser *divergentes* o *convergentes*. En una vía divergente, un metabolito funciona como reactivo en al menos dos conversiones diferentes para formar múltiples pro- ductos. Por ejemplo, el metabolito D de la Figura 12.27 es un punto de bifurcación de una vía divergente, que produce los metabolitos F y H, los cuales siguen rutas de reacción diferentes. En una vía convergente, un metabolito se produce en al menos dos reacciones diferentes, como se muestra para el metabolito F. Algunos metabolitos actúan simultáneamente como puntos de ramificación divergentes y convergentes. En las vías cíclicas, varios metabolitos sirven tanto de reactivos como de productos y se regeneran en cada paso del ciclo.

Las reacciones en cascadas lineales no se representan individualmente en el análisis del flujo metabólico; en su lugar, las reacciones secuenciales se agrupan en un único paso de reacción. Esta forma de agrupación de reacciones reduce significativamente el número de reacciones e intermediarios en el modelo metabólico sin afectar a los resultados globales. Considere la ruta metabólica simple que se muestra en la Figura 12.28(a). El sustrato S entra en una célula y se convierte en el producto P en una secuencia lineal, no ramificada, que implica dos intermediarios, I_1 e I_2 , y tres pasos de reacción. El S se proporciona en el medio externo a la célula; el P se excreta de la célula al medio. I_1 e I_2 son intermediarios internos que permanecen dentro de la célula. No se forman otros productos y la estequiometría para cada paso de la reacción se da en la Figura 12.28(a). La velocidad de absorción del sustrato es r_S y la velocidad de excreción del producto es r_P . Definiremos las *velocidades* de reacción *previstas* para los tres pasos de reacción interna como r_1 , r_2 , y r_3 . De acuerdo con esta definición, r_1 es la velocidad de conversión de S, r_2 es la velocidad

de conversión de I_1 , y r_3 es la velocidad de conversión de I_2 .

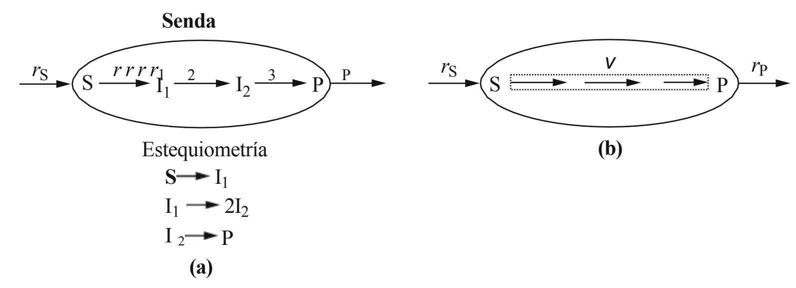


FIGURA 12.28 (a) Vía de reacción lineal, no ramificada, con estequiometría para los pasos de reacción individuales.
(b) Agrupación de reacciones en una vía lineal no ramificada.

Un principio fundamental del análisis de flujos metabólicos es *que las rutas metabólicas pueden funcionar en condiciones estacionarias*. Se trata de un supuesto simplificador clave que nos permite calcular los flujos en las redes metabólicas. Cuando el sistema está en estado estacionario, no puede haber acumulación ni agotamiento de productos intermedios y las concentraciones de todos los metabolitos permanecen constantes. Además, el flujo total que conduce a un metabolito en particular debe ser igual al flujo total que conduce fuera de ese metabolito. Dado que, en estado estacionario, las tasas de reacción a ambos lados de los intermediarios están equilibradas, el análisis del flujo metabólico se denomina a veces *análisis de equilibrio de flujo*.

La suposición del estado estacionario se acepta generalmente como válida porque la tasa de cambio de la mayoría de los intermediarios metabólicos es alta en relación con las cantidades de esos metabolitos presentes en las células en un momento dado. Por lo tanto, dado que el metabolismo se produce en una escala temporal relativamente rápida, cualquier transitorio tras una perturbación es muy rápido en relación con la tasa de crecimiento celular o la regulación metabólica. El supuesto de estado estacionario, que a veces se denomina *supuesto de pseudoestado estacionario*, significa que cualquier dato experimental de cultivo utilizado en el análisis de flujo metabólico debe medirse en condiciones de estado estacionario. En el caso de los cultivos de células microbianas en suspensión, esto implica el funcionamiento de biorreactores de quimiostato continuos. Durante el cultivo en quimiostato, las concentraciones de células y de todos los sustratos y productos en el medio no varían con el tiempo. En algunos casos, los datos del cultivo por lotes o alimentado por lotes se utilizan en el análisis de flujo, ya que la condición de *crecimiento equilibrado* durante el cultivo por lotes (Sección 12.8.2) y la condición *de cuasi-estado estacionario* alcanzada en las operaciones alimentadas por lotes (Sección 14.5.3) pueden considerarse aproximaciones suficientes del estado estacionario. En otros sistemas celulares, como las plantas y los tejidos animales, se requieren dispositivos experimentales diferentes (por ejemplo, biorreactores de perfusión) para proporcionar condiciones aproximadas de estado estacionario.

Si la ruta metabólica de la Figura 12.28(a) funciona en estado estacionario, no puede haber acumulación ni agotamiento de ninguno de los intermediarios de la ruta. Si r_S y r_P se expresan en términos de masa y r_1 , r_2 , y r_3 representan velocidades másicas de reacción en unidades de, por ejemplo , g s^{21} , podemos decir inmediatamente que:

$$r_S \; 5 \; r_1 \; 5 \; r_2 \; 5 \; r_3 \; 5 \; r_P \; 5 \; v \qquad (12.120)$$

porque, en estado estacionario, la velocidad másica de reacción de cualquier intermediario en la secuencia debe ser igual a la velocidad másica de reacción de todos los demás intermediarios para evitar

acumulación o agotamiento de metabolitos. La absorción de sustrato y la excreción de producto también deben ocurrir a esta tasa para mantener concentraciones constantes dentro de la célula. En consecuencia, v en la Ec. (12.120) puede usarse para representar el flujo de masa a través de la vía completa de S a P. De manera similar, la Ec. (12.120) también se aplica si r_S , r_P , r_1 , r_2 , y r_3 representan las tasas a las cuales el carbono es absorbido, excretado y transferido entre intermediarios. Como átomo, el carbono permanece inalterado en los procesos químicos y debe fluir a través de la secuencia a una velocidad constante en condiciones estacionarias. En este caso, v en la Ec. (12.120) representa el flujo de C a través de toda la vía.

Los resultados obtenidos hasta ahora concuerdan con la Tabla 4.1 del Capítulo 4, que indica que las ecuaciones de equilibrio de este- do-estado pueden aplicarse a la masa total y a los átomos durante las reacciones. Sin embargo, el número de moles de los compuestos químicos no suele conservarse en la reacción. Por lo tanto, si r_S , r_P , r_1 , r_2 , y r_3 son tasas molares en unidades de, por ejemplo, mol s^{21} , se requiere información sobre la estequiometría de las reacciones para evaluar los flujos molares relativos a través de la vía. A partir de las estequiometrías de reacción individuales proporcionadas en la Figura 12.28(a), la estequiometría general para la conversión de 1 mol de S en P es S-2P con base en la secuencia estequiométrica:

$$\text{S-I}_1 \text{ -2I}_2 \text{ -2P} \tag{12.121}$$

Como tasas molares de reacción hacia adelante, r_1 , r_2 , y r_3 se definen como sigue:

r_1 5 moles de S convertidos por unidad de tiempo
r_2 5 moles de I_1 convertidos por unidad de tiempo (12.122)
r_3 5 moles de I_2 convertidos por unidad de tiempo

Realicemos balances de masa en cada uno de los componentes de la secuencia de reacción para encontrar las relaciones entre estas velocidades de reacción. Utilizaremos la ecuación general de balance de masas en estado inestable derivada del Capítulo 6:

$$\frac{dM}{dt} \; 5 \; \hat{M}_i \; 2 \; \hat{M}_o \; 1 \; R_G \; 2 \; R_C \tag{6.5}$$

donde M es masa, t es tiempo, $\hat{M}_i$ es el caudal másico que entra en el sistema, $\hat{M}_o$ es el caudal másico que sale del sistema, R_G es la velocidad de generación por reacción química, y R_C es la velocidad de consumo por reacción química. El sistema en este caso es la célula. Aplicando Ec. (6.5) a cada componente de la vía de la Figura 12.28(a):

$$\frac{dM_S}{dt} \; 5 \; (MW)_S \, (r_S) \; 2 \; 0 \; 1 \; 0 \; 2 \; (MW)_S \, (r_1)$$
$$\frac{dM_{I1}}{dt} \; 5 \; 0 \; 2 \; 0 \; 1 \; (MW)_{I1} \, (r_1) \; 2 \; (MW)_{I1} \, (r_2)$$
$$\frac{dM_{I2}}{dt} \; 5 \; 0 \; 2 \; 0 \; 1 \; (MW)_{I2} \, (2r_2) \; 2 \; (MW)_{I2} \, (r_3) \tag{12.123}$$
$$\frac{dM_P}{dt} \; 5 \; 0 \; 2 \; (MW) \, (r) \; 1 \; (MW) \, (r) \; 2 \; 0$$

d*t* P P P 3

En la Ecuación (12.123), MW denota peso molecular y los subíndices S, I1, I2 y P denotan sustrato, I_1 , I_2 y producto, respectivamente. Dado que las ecuaciones son balances de masa, las velocidades de reacción molares r se convierten en velocidades de masa utilizando los pesos moleculares de los compuestos a los que se refieren. También se han aplicado los coeficientes estequiométricos para cada componente en la secuencia de reacción. Por ejemplo, en el balance de masa para I_1 , la tasa de masa de generación de I_1 por reacción química se muestra como $(MW)_{I1}$ $(r_1$), donde r_1 se usa para representar la tasa molar de producción de I_1 . Sin embargo, como se indica en la Ecuación (12.122), r_1 se define en términos de los moles de S reaccionados. Podemos usar r_1 en el balance de masa para I_1 porque sabemos por la estequiometría de la reacción que la conversión de 1 mol de sustrato produce 1 mol de I_1 . Por lo tanto, la tasa molar de conversión de S es igual a la tasa molar de pro- ducción de I_1 . El coeficiente estequiométrico 2 aparece en la ecuación de balance de masa para I_2 . Dado que, a partir de la Ecuación (12.122), r_2 es el número de moles de I_1 reaccionados por unidad de tiempo, a partir de la estequiometría de conversión de I_1 a I_2 , el número de moles de I_2 formados por unidad de tiempo debe ser $2r_2$. Por lo tanto, $2r_2$ aparece en el balance para I_2 como la tasa molar de generación de I_2 por reacción. La tasa molar a la que I_2 se convierte en P se ha definido como r_3 en la Ecuación (12.122). Por consiguiente, no se requiere un coeficiente estequiométrico para el término de consumo en el equilibrio para I_2 .

En estado estacionario, las derivadas con respecto al tiempo en la Ecuación (12.123) son cero, ya que no puede haber cambio en la masa de ningún componente. La aplicación de este resultado nos permite cancelar los términos de peso molecular y simplificar las ecuaciones para dar:

$$\begin{aligned} r_S \; 5 \; r_1 \\ r_1 \; 5 \; r_2 \\ 2r_2 \; 5 \\ r_3 \\ r_3 \; 5 \; r_P \end{aligned} \qquad (12.124)$$

o

$$r_S \; 5 \; r_1 \; 5 \; r_2 \; 5 \; 0{,}5r_3 \; 5 \; 0{,}5r_P \; 5 \; v \qquad (12.125)$$

La Ec. (12.125) se aplica cuando las velocidades de reacción se expresan como velocidades molares.

Nuestro análisis de la secuencia de reacción de la Figura 12.28(a) ha demostrado que los flujos de masa, átomos de carbono y moles a través de una ruta metabólica lineal y no ramificada pueden representarse usando una sola tasa v, como se ilustra en la Figura 12.28(b). De acuerdo con nuestra definición de velocidad de reacción, v *es* una velocidad de avance, es decir, v representa la velocidad de conversión de S. Mientras que r denota la velocidad de reacción para cada reacción individual, v puede representar la velocidad general de reacciones agrupadas, o la velocidad de reacción a través de varios pasos de reacción. Seguiremos utilizando r_S y r_P para las velocidades de absorción de sustrato y excreción de producto, respectivamente, de acuerdo con las secciones anteriores de este capítulo. Estas tasas difieren del flujo interno v en que generalmente son fácilmente medibles.

Cuando v *se* expresa en términos de masa o átomos de C, a partir de la Ecuación (12.120), v es igual a cada una de las tasas de reacción individuales en cada paso de la ruta,

independientemente de la estequiometría. Sin embargo, el análisis del flujo metabólico se realiza generalmente utilizando flujos expresados como tasas molares. Cuando se utilizan tasas molares, la relación entre las tasas de reacción individuales y v para reacciones agrupadas depende de la estequiometría de la reacción, como se indica en el ejemplo de la Ecuación (12.125). El uso de v en unidades de mol s^{21} para representar el flujo global de moles

de S a P no implica que la tasa molar de conversión de todos los intermedios en la agrupación sea también v mol s^{21} . Sin embargo, el uso de v para denotar la tasa molar de las reacciones agrupadas sí significa que la tasa global de conversión de S a P puede representarse como v moles de S por segundo, siempre que se utilice la estequiometría correcta para la conversión, en este caso S-2P, junto con dicha tasa.

La agrupación de reacciones nos permite omitir los intermediarios a lo largo de las secciones lineales de las vías, de modo que sólo sea necesario considerar los intermediarios en los puntos de ramificación. Por ejemplo, dependiendo del propósito y el alcance del análisis de flujo, la secuencia de reacción en la glucólisis:

gliceraldehído-3-fosfato-1, 3-difosfoglicerato- 3-fosfoglicerato
- El 2-fosfoglicerato-fosfoenolpiruvato-piruvato podría

representarse como:

gliceraldehído-3-fosfato-3-fosfoglicerato-fosfoenolpiruvato-piruvato

porque los intermediarios 1,3-difosfoglicerato y 2-fosfoglicerato no son puntos de ramificación que conduzcan a otras vías metabólicas. Por lo tanto, estos intermediarios pueden agruparse en reacciones agrupadas, como se muestra anteriormente en el mapa de flujo de la Figura 12.26. También pueden racionalizarse otras reacciones metabólicas. Por ejemplo, dependiendo del objetivo del análisis, la síntesis de ácidos grasos puede agruparse en una única reacción si se conocen las fracciones de diferentes ácidos grasos en la célula. Los pasos individuales en las rutas biosintéticas de ácidos orgánicos como el fumarato y el succinato también pueden agruparse por conveniencia, siempre que la incorporación de nitrógeno y la incorporación o evolución de CO_2 se tengan en cuenta en la reacción agrupada. Para los análisis de flujo con balances de energía y redox, la participación de ATP y/o NADH también debe incluirse en cualquier representación agrupada de reacciones.

Una vez determinadas las reacciones que se incluirán en la red, se requiere una lista completa de los metabolitos implicados y sus ecuaciones de reacción química. La estequiometría de las reacciones, ya sea real o global, debe ser exacta y las ecuaciones de reacción deben estar equilibradas. Todos los átomos de C deben tenerse en cuenta en el modelo metabólico simplificado. Como se ha mencionado anteriormente, el análisis del flujo metabólico se realiza generalmente utilizando flujos expresados en moles. Sin embargo, debido a que estamos interesados principalmente en la distribución del carbono dentro de las vías, el flujo a veces se reporta en términos de moles de C en lugar de moles de compuestos químicos. Las ecuaciones de reacción y la estequiometría pueden ser modificadas para reflejar esto, usando fórmulas químicas para compuestos que contienen C basadas en 1 átomo de C, y escribiendo cada reacción para la conversión de 1 mol de C. Como ejemplo, la ecuación de reacción para la conversión de glucosa en etanol es usualmente escrita usando una base de 1 mol de glucosa:

$$C\,H\,O_{6126} \text{-}2\; C\; H_{26}\; O\; 1\; 2\; CO_2 \tag{12.126}$$

donde C H O_{6126} es glucosa y C H_{26} O es etanol. Esta ecuación reescrita utilizando una base de 1 mol de carbono es:

$$CH_2\; O\text{-}0{,}67\; CH\; O_{30.5}\; 1\; 0{,}33\; CO_2 \tag{12.127}$$

donde CH_2 O representa la glucosa y CH $O_{30.5}$ representa el etanol. En la Ecuación (12.127), las fórmulas para todos los compuestos se basan en 1 átomo de C o 1 *mol de C*, donde 1 mol de C es 6.02 3 10^{23} átomos de carbono. Esto afecta los coeficientes estequiométricos requeridos para lograr el equilibrio elemental en la ecuación de reacción. La reacción de la Ecuación (12.127) comienza con un sexto de la masa de glucosa utilizada en la Ecuación (12.126); sin embargo, por lo demás, las dos reacciones son iguales. La ventaja de escribir las ecuaciones de reacción en C-mol es que la información sobre la cantidad de carbono transferida de un reactivo a un producto particular está contenida sólo en los coeficientes estequiométricos. De la Ec. (12.127), podemos ver inmediatamente que dos tercios del C de la glucosa se transfieren al etanol. Si estuviéramos trabajando con la Ecuación (12.126), esta información sólo estaría disponible después de multiplicar el coeficiente estequiométrico para el etanol (2) por el número de átomos de C en una molécula de etanol (2) y dividir el resultado por el número de átomos de C en una molécula de glucosa (6). Representar las reacciones en mol de C es útil para evaluar el flujo de carbono a través de las rutas metabólicas. Una desventaja es que las fórmulas en C-mol de los reactivos y productos pueden no reconocerse tan fácilmente como sus fórmulas moleculares completas.

Los flujos en ingeniería metabólica se expresan normalmente como tasas específicas (Sección 12.1.3). Por ejemplo, un flujo puede expresarse en unidades de mol (g de peso seco de las células)^{21} h^{21} o, alternativamente, como C-mol (g de biomasa)^{21} h^{21} o C-mol (C-mol de biomasa)^{21} h^{21} . Un C-mol de biomasa se representa mediante la "fórmula" química de las células secas normalizada a un átomo de carbono, CH O $N_{\alpha\beta\delta}$, tal y como se describe en la Sección 4.6.1 del Capítulo 4. Para la biomasa celular sin cenizas de composición media de C, H, O y N, 1 C-mol de biomasa pesa unos 24,6 g.

Formulación de ecuaciones mediante matrices

Consideremos ahora la ruta metabólica ramificada de la Figura 12.29, donde la ruta de S se divide en el intermediario I para formar dos productos, P_1 y P_2 , que se excretan a velocidades r_{P1} y r_{P2} , respectivamente. Las vías de S a I, de I a P_1 , y de I a P_2 pueden comprender múltiples pasos de reacción, pero éstos han sido agrupados como se discutió en la sección anterior, de manera que los flujos están representados por tasas de avance v_1 , v_2 , y v_3 a través de las tres ramas. En la Figura 12.29 se muestra la estequiometría de las reacciones agrupadas para cada rama. Llevaremos a cabo el análisis utilizando tasas expresadas en unidades de mol g^{21} h^{21} . Para simplificar, la vía no implica energía ni conversiones redox.

Utilizaremos esta vía metabólica para ilustrar las técnicas matemáticas empleadas en el análisis de flujos metabólicos. El objetivo es calcular los flujos internos v_1 , v_2 , y v_3 . Aunque la solución a este problema es trivial, es un ejercicio útil seguir la misma

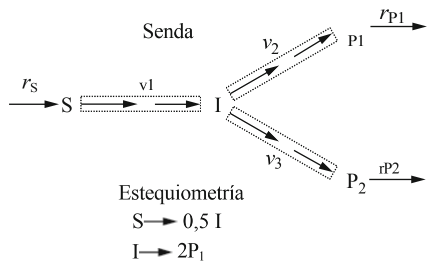


FIGURA 12.29 Vía ramificada divergente con estequioma-para las reacciones agrupadas en cada rama.

$I \longrightarrow P_2$

aplicados a sistemas más grandes y complejos. Usando la Ec. (6.5) y una base de 1 g de biomasa cel- lular, las ecuaciones de balance de masa en estado inestable para S, I, P_1 , y P_2 son:

$$\frac{dM_S}{dt} \; 5 \; (MW)_S \, (r_S) \; 2 \; 0 \; 1 \; 0 \; 2 \; (MW)_S \, (v_1)$$
$$\frac{dM_I}{dt} \; 5 \; 0 \; 2 \; 0 \; 1 \; (MW)_{I1} \, (0{,}5 v_1) \; 2 \; (MW)_{I1} \, (v_2) \; 2 \; (MW)_{I1} \, (v_3)$$
$$\frac{dM_{P1}}{dt} \; 5 \; 0 \; 2 \; (MW)_{P1} \, (r_{P1}) \; 1 \; (MW)_{P1} \, (2v_2) \; 2 \; 0 \tag{12.128}$$
$$\frac{dM_{P2}}{dt} \; 5 \; 0 \; 2 \; (MW)_{P2} \, (r_{P2}) \; 1 \; (MW)_{P2} \, (v_3) \; 2 \; 0$$

Como se explicó en relación con la Ecuación (12.123), los coeficientes estequiométricos 0.5 y 2 son requeridos en las ecuaciones de balance de masa para I y P_1 para representar las tasas de generación de estos componentes, consistente con la definición de las tasas como tasas de reacción hacia adelante. En el estado estacionario , la Ec. (12.128) se convierte en:

$$r_S \; 2 \; v_1 \; 5 \; 0$$
$$0{,}5 v_1 \; 2 \; v_2 \; 2 \; v_3 \; 5 \; 0$$
$$2v_2 \; 2 \; r_{P1} \; 5 \; 0 \tag{12.129}$$
$$v_3 \; 2 \; r_{P2} \; 5 \; 0$$

Estas ecuaciones algebraicas lineales pueden organizarse en forma de matriz. Definamos un vector columna v que contenga los seis índices como elementos:

$$v \; 5 \begin{bmatrix} r_S \\ v_1 \\ v_2 \\ v \\ r_{P1} \\ r_{P2} \end{bmatrix} \tag{12.130}$$

y una matriz S que contiene los coeficientes de las tasas de la Ec. (12.129):

$$S \; 5 \begin{bmatrix} 1 & 21 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & 21 & 21 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2 & 0 & 21 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 21 \end{bmatrix} \tag{12.131}$$

Cada fila de S representa una ecuación de balance de masa, por lo que, en este ejemplo, hay cuatro filas. Cada columna en S contiene coeficientes para cada una de las seis tasas que definen el vector v; por lo tanto, en este caso, hay seis columnas. La primera columna en S contiene los coeficientes para r_S , la segunda para v_1 , la tercera para v_2 , y así sucesivamente

para el resto de v. Típicamente, S para grandes redes metabólicas es una matriz relativamente dispersa con muchos elementos nulos ya que la mayoría de los coeficientes de v son cero.

Las reacciones metabólicas implican sólo unos pocos componentes. Nótese que S puede definirse de diferentes maneras y la disposición de los elementos en la matriz de la Ec. (12.131) se denomina a veces en la literatura S^T , o la transposición (Apéndice E) de la matriz estequiométrica.

Utilizando la notación matricial, la Ec. (12.129) puede escribirse sucintamente como:

$$Sv\ 5\ 0 \tag{12.132}$$

La multiplicación de S y v se lleva a cabo utilizando las reglas para operaciones matriciales descritas en la Sección E.4 del Apéndice E. Las reglas para multiplicar una matriz y un vector columna dadas en la Ec. (E.46) pueden usarse para verificar que las Ecs. (12.129) y (12.132) son equivalentes.

Sistemas indeterminados y sobredeterminados

Hay seis tasas o flujos en la Ec. (12.129) pero sólo cuatro ecuaciones de balance de masa. Para cualquier red metabólica, si hay *M* ecuaciones algebraicas lineales, una para cada uno de los *M* meta- bolitos, y *R flujos* de reacción, el grado de libertad *F* en el sistema es:

$$F\ 5\ R\ 2\ M \tag{12.133}$$

Normalmente, el número de reacciones *R* en una ruta metabólica es mayor que el número de metabolitos *M*. Un sistema de este tipo en el que *F* - 0 está *subdeterminado*, ya que no hay suficiente información disponible para resolver todas las tasas en las ecuaciones de equilibrio de masa. Para permitir la solución de la Ec. (12.132), se deben medir algunos de los elementos de la tasa en v, o se deben introducir restricciones adicionales en las ecuaciones, antes de que se puedan determinar las tasas restantes. Si se miden F tasas y, por lo tanto, se conocen independientemente, el sistema se *determina* y se puede encontrar una única solución para los flujos restantes. Si se miden más de *F tasas*, el sistema está *sobredeterminado*. Un sistema sobredeterminado no es fácil de conseguir en el análisis de flujos metabólicos, pero es deseable porque la información adicional se puede utilizar con fines de comprobación. Esto se discute con más detalle en la Sección 12.16.1 (subsección Validación).

Para nuestro problema representado por las Ecs. (12.129) y (12.132), llevemos el sistema a un estado determinado de manera que se pueda encontrar una solución única para los flujos. De acuerdo con la Ec. (12.133), *F* 5 6 2 4 5 2, así que necesitamos medir dos de los flujos en v. Como es mucho más fácil observar los flujos externos que los internos, r_S , r_{P1} , y r_{P2} son candidatos obvios para la medición experimental. Sin embargo, sólo necesitamos dos de ellas, así que vamos a elegir medir r_{P1} y r_{P2} . Estas tasas se pueden agrupar en un nuevo vector para las tasas medidas v_m , mientras que las tasas desconocidas restantes se recogen en otro vector v_c para el cálculo del flujo . Podemos escribir la Ec. (12.132) como:

$$Sv\ 5\ S\ v_{mm}\ 1\ S\ v_{cc}\ 5\ 0 \tag{12.134}$$

donde

$$v_m\ 5\ \begin{matrix} r_{P1} \\ r_{P2} \end{matrix} \tag{12.135}$$

y

$$v_c = \begin{bmatrix} r_S \\ v_1 \\ v_2 \\ v_3 \end{bmatrix} \quad (12.136)$$

A partir de los coeficientes de la Ec. (12.129) para r_{P1} y r_{P2} :

$$S_m = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (12.137)$$

y

$$S_c = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (12.138)$$

Ambas matrices S_m y S_c contienen cuatro filas, una para cada ecuación de balance de masas. Los elementos en las dos columnas de S_m son los coeficientes en las ecuaciones de balance de masa para las tasas medidas, r_{P1} y r_{P2} , respectivamente. Las cuatro columnas de S_c contienen los coeficientes para las cuatro tasas en el vector v_c , es decir, r_S , v_1 , v_2 , y v_3 , en ese orden.

La solución de este problema para encontrar los flujos internos v equivale a resolver los elementos desconocidos del vector v_c . Una vez que hemos medido r_{P1} y r_{P2} , los elementos de v_m , S_m , y S_c son conocidos. Podemos escribir la Ec. (12.134) como:

$$S_c v_c = -S_m v_m \quad (12.139)$$

o, utilizando las reglas para operaciones matriciales descritas en el Apéndice E:

$$v_c = -S_c^{-1} S_m v_m \quad (12.140)$$

La solución para v_c requiere el cálculo de la inversa de la matriz S_c . Como se describe en la Sección E.4 del Apéndice E, la inversa de una matriz sólo puede determinarse si la matriz es cuadrada y de rango completo. En nuestro ejemplo, S_c es una matriz cuadrada 4×4 : esto es una consecuencia de que el sistema se determine de forma que el número de tasas desconocidas sea igual al número de ecuaciones disponibles para resolverlas. Para ser de rango completo, la matriz no debe contener ninguna fila o columna que sea una combinación lineal de otras filas o columnas. El determinante de una matriz de rango completo es distinto de cero (Sección E.4); por lo tanto, calcular el determinante nos permite comprobar si S_c se puede invertir.

Encontrar los determinantes de las matrices es cada vez más complejo a medida que aumenta el tamaño de la matriz. Sin embargo, los programas de hojas de cálculo disponibles habitualmente realizan el cálculo; también pueden utilizarse programas informáticos especializados para el análisis del flujo metabólico. Para

S_c definida en la Ec. (12.138), aplicando el programa informático adecuado se obtiene det (S_c) 5 1.0. Como este determinante /= 0, sabemos que S_c es invertible. Una aplicación adicional del software de solución de matrices da la inversa de S_c como:

$$S_c^{21} 5 \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 & 2 \\ 0 & 2 & 1 & 2 \\ 0 & 0.5 & 0 & \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (12.141)$$

Este resultado puede verificarse comprobando que el producto S_c S_c^{21} es igual a la matriz identidad, I (Sección E.4, Apéndice E).

Si se encuentra que la matriz S_c es singular (es decir, det (S_c) 5 0) de manera que S_c no puede ser invertida, la solución no puede proceder sin modificar las ecuaciones. Cuando S_c es singular, es probable que una o más de las ecuaciones de balance de masa utilizadas para formular el problema sea una combinación lineal de una o más de las otras ecuaciones. En esta situación, aunque el sistema pueda parecer determinado, en realidad está subdeterminado. Cuando se analiza un gran número de reacciones metabólicas, las dificultades con elementos linealmente dependientes en las ecuaciones ocurren con cierta frecuencia. Para dar flexibilidad a los organismos en diferentes condiciones ambientales, el metabolismo celular contiene muchas vías complementarias y redundantes que cumplen la misma función que otras si funcionan al mismo tiempo. Algunas áreas particulares del metabolismo, como la asimilación del amoníaco, las vías anapleróticas, las reacciones isoenzimáticas y las reacciones transhidrogenasa, se prestan a la representación mediante ecuaciones linealmente dependientes. Los ensayos intracelulares pueden ser necesarios para resolver la singularidad creada por vías relacionadas, proporcionando información adicional sobre sus actividades relativas. Otra posibilidad es agrupar las vías complementarias en una única reacción. Los equilibrios sobre *elementos conservados*, como ATP, ADP y AMP, y pares de cofactores como NAD y NADH, son linealmente dependientes porque la concentración total de elementos conservados permanece constante aunque haya intercambio entre diferentes miembros del grupo. Por lo tanto, los equilibrios en un solo compuesto en grupos conservados se incluyen en el análisis de flujo para evitar la singularidad de la matriz. A menudo es necesario identificar y eliminar las ecuaciones dependientes cambiando la red metabólica o introduciendo otra información en el procedimiento de solución para que S_c sea invertible. A veces, incluso si la matriz completa de coeficientes S no es singular, la elección de las tasas para la medición experimental hace que S_c sea singular, lo que indica que una o más de las tasas medidas son redun- dantes. Cuando esto ocurre, se requiere una combinación diferente de mediciones para permitir la solución del balance de flujo.

Solución de las ecuaciones

Supongamos que los resultados medidos para r_{P1} y r_{P2} son r_{P1} 5 0,05 mol g^{21} h^{21} y r_{P2} 5 0.08 mol g^{21} h^{21} . Por lo tanto, podemos escribir la Ec. (12.135) como:

$$v_m \; 5 \begin{bmatrix} 0{,}05 \\ 0.08 \end{bmatrix} \text{mol } g^{21} \, h^{21} \quad (12.142)$$

Aplicando las Ecs. (12.137), (12.141) y (12.142) en la Ec. (12.140) se obtiene la siguiente ecuación para v_c :

$$v_c = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 & 2 \\ 0 & 2 & 1 & 2 \\ 0 & 0 & 0{,}5 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0.05 \\ 0.08 \end{bmatrix} \text{mol g}^{-1}\ \text{h}^{-1} \tag{12.143}$$

Utilizando la regla de multiplicación asociativa Ec. (E.39) del Apéndice E:

$$v_c = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 & 2 & 0 \\ 0 & 2 & 1 & 2 & 0 \\ 0 & 0 & 0.5 & 0 & 20.05 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 20.08 \end{bmatrix} \text{mol g}^{-1}\ \text{h}^{-1} \tag{12.144}$$

Una multiplicación más da:

$$v_c = \begin{bmatrix} 20.21 \\ 20.21 \\ 20.025 \\ 20.08 \end{bmatrix} \text{mol g}^{-1}\ \text{h}^{-1} \tag{12.145}$$

o

$$v_c = \begin{bmatrix} 0.21 \\ 0.21 \\ 0{,}025 \\ 0.08 \end{bmatrix} \text{mol g}^{-1}\ \text{h}^{-1} \tag{12.146}$$

La ecuación (12.146) proporciona los valores para los flujos desconocidos. De la definición de v_c en la Ecuación (12.136), los resultados son $r_S = 0.21$ mol g^{-1} h^{-1} , $v_1 = 0.21$ mol g^{-1} h^{-1} , $v_2 =$ 0.025 mol g^{-1} h^{-1} , y $v_3 = 0.08$ mol g^{-1} h^{-1} . Se puede ver fácilmente que estos resultados, junto con los valores medidos para r_{P1} y r_{P2} , satisfacen los balances de masa de la Ec. (12.129).

Los rendimientos de los productos en el cultivo celular están controlados por la *relación de división del flujo* o la *relación de partición del flujo* Φ en los puntos de ramificación críticos de la red metabólica. A partir de nuestro análisis de la ruta de la Figura 12.29, podemos calcular la relación de división del flujo entre los dos productos P_1 y P_2 en el punto de ramificación I:

$$\Phi_{P1} = \frac{\text{flux to } P_1}{\text{flujo hacia } P_1 + \text{flujo hacia } P_2} = \frac{v_2}{v_2 + v_3} = \frac{0.025}{0{,}025 + 0{,}08} = 0.24 \tag{12.147}$$

y

$$\Phi_{P2} = \frac{\text{flux to } P_2}{\text{flujo hacia } P_1 + \text{flujo hacia } P_2} = \frac{v_3}{v_2 + v_3} = \frac{0.08}{0{,}025 + 0{,}08} = 0.76 \tag{12.148}$$

El problema que acabamos de resolver era muy sencillo. Una vez conocidos los

resultados medidos para r_{P1} y r_{P2} , las ecuaciones algebraicas de la Ec. (12.129) podrían haberse resuelto fácilmente para llegar a la solución de la Ec. (12.146) sin necesidad de formular el problema utilizando

matrices. Sin embargo, el procedimiento descrito aquí ilustra el enfoque matemático necesario cuando se investigan redes metabólicas realistas que implican de 20 a 50 flujos. Se han desarrollado modelos estequiométricos a escala genómica con más de 2000 reacciones para organismos como *Escherichia coli* [24]. En tales casos, la solución simultánea de las ecuaciones de balance de masa es difícil sin el uso de métodos matriciales. El análisis de flujo de una ruta metabólica real se ilustra en el Ejemplo 12.10.

Balances energético y redox y producción de biomasa

El análisis del flujo metabólico puede llevarse a cabo utilizando únicamente ecuaciones de balance de masa, como se ilustra en el ejemplo anterior. Sin embargo, la adición de ecuaciones de balance para cofactores como la energía y los portadores redox proporciona restricciones adicionales en el sistema, reduce el grado de libertad y, por lo tanto, puede ser necesaria para la solución. También garantiza que se dispone de suficiente energía y equivalentes reductores para que se produzcan las reacciones y puede ser útil para vincular los flujos de una subred del metabolismo a otra. Sin embargo, si se incluyen los cargadores de energía y redox, deben representarse todas las reacciones en las que intervienen estos cofactores para evitar errores sustanciales en la estimación de flujos. Esto puede resultar problemático, ya que es posible que no se conozca la participación de los cofactores en cada área del metabolismo celular. La necesidad de contabilizar completamente todas las instancias de generación y consumo de ATP y todas las transacciones redox es una fuente común de error en el análisis del flujo.

Como se discutió en la Sección 12.16.1 (subsección de Sistemas Subdeterminados y Sobredeterminados) los balances para un solo miembro de los grupos de cofactores conservados se utilizan para evitar la generación de ecuaciones linealmente dependientes y la singularidad de la matriz. Además, por simplicidad, todos los portadores de energía suelen representarse como ATP y todos los portadores redox como NADH, aunque en el metabolismo intervengan otros portadores de energía como GTP y otros agentes reductores como NADPH y $FADH_2$. Para tener en cuenta las necesidades de mantenimiento celular y el funcionamiento de ciclos fútiles, puede incluirse en el análisis una reacción para disipar el exceso de ATP.

La biomasa se incluye a menudo en el análisis de flujos como producto del metabolismo. El crecimiento celular proporciona un sumidero para el ATP y los compuestos precursores de las vías catabólicas, así como para metabolitos de construcción como aminoácidos, nucleótidos y lípidos. Una ecuación estequiométrica para la producción de biomasa representada como CH O $N_{\alpha\beta\delta}$ se determina a partir de la composición de las células (Sección 4.6.1) o de la información sobre los requerimientos metabólicos para la síntesis de varios constituyentes de la biomasa. Por ejemplo, el crecimiento puede simularse creando una ecuación de reacción global que extraiga metabolitos como polisacáridos, proteínas, ADN, ARN y lípidos de sus respectivas rutas biosintéticas en proporciones que reflejen la composición de las células. La velocidad de la reacción de crecimiento puede entonces escalarse para que el flujo sea igual a la velocidad de crecimiento exponencial del organismo. La modelización de la síntesis de biomasa puede ser el aspecto más difícil de la definición de redes para el análisis del flujo metabólico.

EJEMPLO 12.10 ANÁLISIS DE FLUJO PARA LA FERMENTACIÓN ÁCIDA MIXTA

Las vías metabólicas de la fermentación anaeróbica de ácidos mixtos se han estudiado ampliamente. En determinadas condiciones de cultivo, las bacterias lácticas catabolizan la glucosa para producir ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol. La vía de esta fermentación se muestra en

Figura 12.30. Para las células, el propósito principal de la vía es generar ATP para el crecimiento. No hay o hay muy poco intercambio de intermediarios al metabolismo anabólico; la vía también es autosuficiente en equivalentes reductores.

Se utiliza un quimiostato para obtener resultados experimentales del cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en condiciones estacionarias. La tasa de absorción de glucosa se mide como 0,01 mol h^{21} por g de peso seco de las células. El rendimiento de ácido láctico a partir de glucosa es de 0,49 mol mol^{21} y e l d e ácido fórmico a partir de glucosa es de 0,41 mol mol^{21} .

(a) Dibuje un diagrama de vías simplificado adecuado para el análisis del flujo metabólico.
(b) Realice un balance de flujos en la red metabólica simplificada. Etiquete la ruta con los resultados del flujo en unidades de C-mol g^{21} h^{21} .
(c) ¿Cuál es la relación de división del flujo en piruvato para la producción de lactato?
(d) ¿Cuál es la relación de división del flujo en la acetil coenzima A (acetil CoA) para la producción de acetato y etanol?
(e) Estimar el rendimiento observado de etanol a partir de glucosa en mol^{21} .
(f) ¿Cuál es la tasa de generación de ATP para el crecimiento y el mantenimiento de las células?

Solución

(a) En esta fermentación, los intermediarios de la glucólisis no se utilizan para la biosíntesis y el crecimiento. Por lo tanto, la vía de la glucosa al piruvato puede considerarse una secuencia lineal de reacciones sin puntos de ramificación. Las reacciones glucolíticas individuales se agrupan en u n único paso de reacción, preservando los requisitos netos de cofactores de la glucólisis. Los principales puntos de bifurcación de la vía son el piruvato y el acetil-CoA. Los pasos de acetil CoA a acetato, y de acetil CoA a etanol, también son secuencias lineales y pueden agruparse en dos reacciones agrupadas. La vía simplificada resultante se muestra en la Figura 12.31.

(b) Las ecuaciones estequiométricas para las reacciones de la vía simplificada pueden encontrarse en los textos de bioquímica y se enumeran a continuación. Las ecuaciones están escritas en base molar.

glucosa 1 2 ADP 1 2 NAD-2 piruvato 1 2 ATP 1 2 NADH 1 2 H_2O
piruvato 1 NADH-lactato 1 NAD
piruvato 1 CoA 1 NAD-acetil CoA 1 CO_2 1 NADH
piruvato 1 CoA-formato 1 acetil CoA
acetil CoA 1 ADP-acetato 1 CoA 1 ATP
acetil CoA 1 2 NADH-etanol 1 CoA 1 2 NAD
ATP-ADP

La estequiometría general y los requisitos de cofactores para la conversión glucolítica de glucosa en piruvato son bien conocidos. Los coeficientes estequiométricos en el resto de reacciones son iguales, excepto que 2 NADH y 2 NAD intervienen en la reacción agrupada de conversión de acetil CoA en etanol. Las velocidades de avance de las reacciones internas están marcadas como v_1 a v_7 en la Figura 12.31. Las tasas de absorción de sustrato y excreción de producto se etiquetan r_G , r_L , r_C , r_F , r_A , y r_E para glucosa, lactato, CO_2 , formiato, acetato y etanol, respectivamente. Como la vía genera una cantidad neta positiva de ATP, se incluye una reacción ATP-ADP que representa las necesidades de ATP para el crecimiento y el mantenimiento, de modo que se pueda cerrar el balance de masa para el ATP.

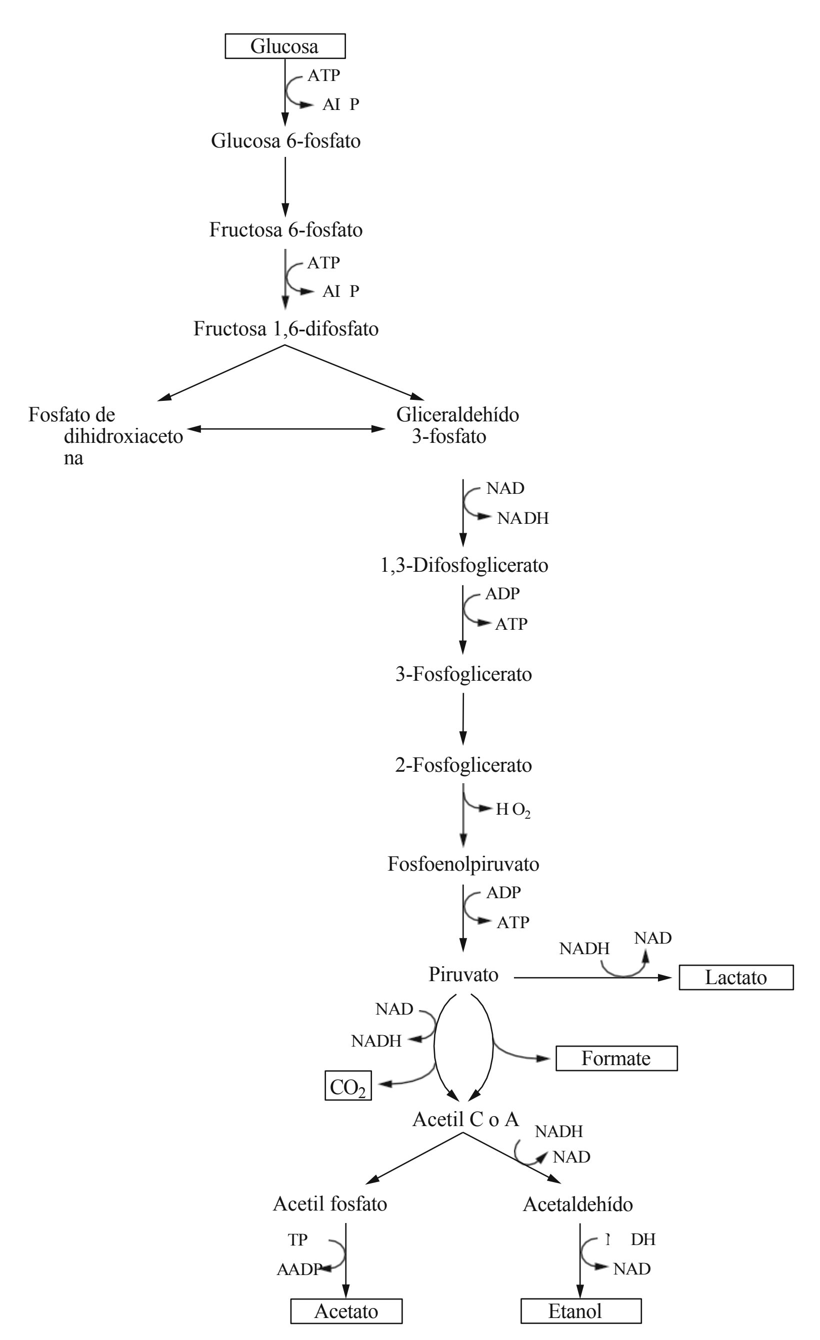


FIGURA 12.30 Vía metabólica de la fermentación de ácidos mixtos.

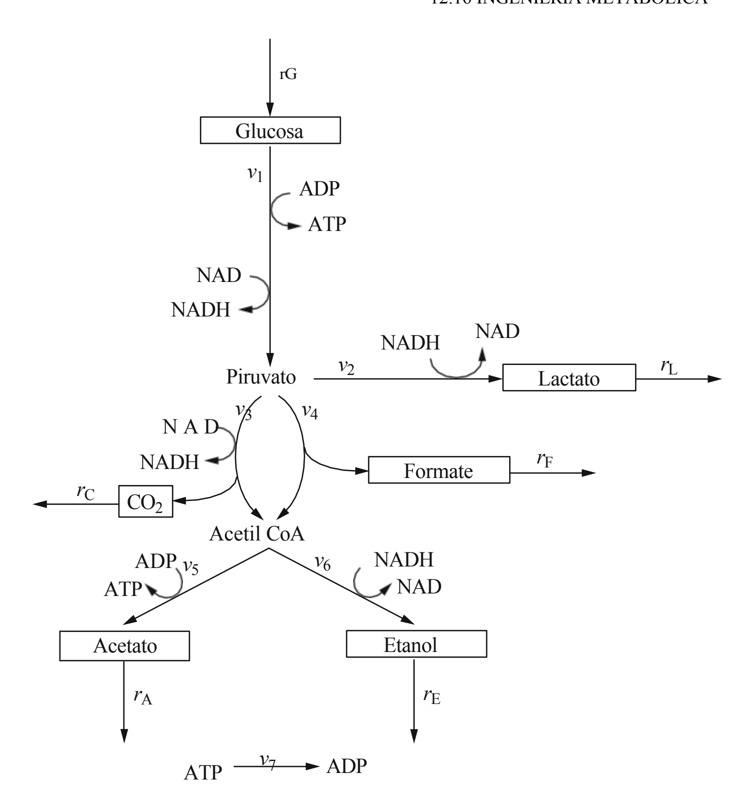


FIGURA 12.31 Gráfico de simplifía metabólica del ácido mixto fermentación.

Se realizan balances de masa en estado estacionario para la glucosa y los productos excretados, los intermediarios internos en los puntos de ramificación y los portadores redox y energéticos:

glucosa: r_G 2 v_1 5 0
piruvato: $2v_1$ 2 v_2 2 v_3 2 v_4 5 0
lactato: v_2 2 r_L 5 0
CO_2 : v_3 2 r_C 5 0
formiato: v_4 2 r_F 5 0
acetil CoA: v_3 1 v_4 2 v_5 2 v_6 5 0
acetato: v_5 2 r_A 5 0
etanol: v_6 2 r_E 5 0
NADH: $2v_1$ 2 v_2 1 v_3 2 $2v_6$ 5 0
ATP: $2v_1$ 1 v_5 2 v_7 5 0

Como se indica en la sección 12.16.1 (subsección Sistemas subdeterminados y sobredeterminados), los equilibrios se realizan para un solo componente implicado en la transferencia redox y un componente implicado en la transferencia de energía; por lo tanto, los equilibrios para NAD y ADP no son

incluidos. En total, hay 7 flujos internos (v) y 6 externos (r), lo que hace un total de 13 tasas desconocidas. Hay 10 metabolitos/cofactores que dan 10 ecuaciones de balance de masa. De la Ec. (12.133), el grado de libertad F para el sistema es:

$$F = 13 - 10 = 3$$

Como se dispone de tres mediciones experimentales de cultivos en quimiostatos, el sistema está determinado y puede resolverse para encontrar una solución única. El valor medido para r_G es 0,01 mol g^{-1} h^{-1}. A partir de los coeficientes de rendimiento para el lactato y el formiato y la definición de Y_{PS} en la Tabla 12.4:

$$r_L = Y\, r_{PSG} = 0{,}49 \text{ mol mol}^{-1}\,(0{,}01 \text{ mol g}^{-1}\,\text{h}^{-1}) = 0{,}0049 \text{ mol g}^{-1}\,\text{h}^{-1}$$

$$r_F = Y\, r_{PSG} = 0{,}041 \text{ mol mol}^{-1}\,(0{,}01 \text{ mol g}^{-1}\,\text{h}^{-1}) = 0{,}0041 \text{ mol g}^{-1}$$

h^{-1} El vector de flujos medidos v_m y la matriz correspondiente S_m son:

$$v_m = \begin{bmatrix} r_G \\ r_L \\ r_F \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.0\ 1 \\ 0{,}0049 \\ 0.0041 \end{bmatrix} \text{mol g}^{-1}\,\text{h}^{-1} \qquad S_m = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Los elementos de S_m son los coeficientes de las ecuaciones de balance de masa para r_G, r_L, y r_F. Cada fila de S_m representa una ecuación de balance de masa; la primera columna de S_m contiene los coeficientes para r_G, la segunda para r_L, y la tercera para r_F. Las 10 tasas restantes definen el vector de flujos calculados, v_c. La matriz de coeficientes correspondiente S_c se obtiene a partir de las ecuaciones de balance de masa:

$$v_c = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ r_C \\ r_A \\ r_E \end{bmatrix} \qquad S_c = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 2 & -1 & 1 & 0 & 0 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

S_c es no singular con det (S_c) 522. Se utiliza un software de cálculo de matrices para determinar la inversa de S_c :

S_c^{21} 5

21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
22	21	21	0	21	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	20.5	0	0	0.5	21	0	0	0.5	0
22	20.5	21	0	20.5	0	0	0	20.5	0
22	20.5	0	0	0.5	21	0	0	0.5	21
22	21	21	21	21	0	0	0	0	0
0	20.5	0	0	0.5	21	21	0	0.5	0
22	20.5	21	0	20.5	0	0	21	20.5	0

Aplicando la Ec. (12.140):

2 3 3
221 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0
0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
622 21 21 0 21 0 0 0 0 0 7 6 0 21 0 7
0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 2 0.0 1 3
v_c 52 6 0 20.5 0 0 0.5 21 0 0 0.5 0 7 6 0 0 21 0 7 4 0.0049 5 mol g21 h21
622 20.5 21 0 20.5 0 0 0 20,5 0 7 6 0 0 0 7
0.0041
6 22 20.5 0 0 0.5 21 0 0 0.5 21 7 6 0 0 0 7
6 22 21 21 21 21 0 0 0 0 7 6 0 0 0 7
4 0 20.5 0 0 0.5 21 21 0 0.5 0 5 4 0 0 0 5
22 20.5 21 0 20.5 0 0 21 20.5 0 0 0 0

Multiplicando primero S_m por v_m :

v_c 52

21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
22	21	21	0	21	0	0	0	0	0	20.0049
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	20.5	0	0	0.5	21	0	0	0.5	0	20.0041
22	20.5	21	0	20.5	0	0	0	20.5	0	0
22	20.5	0	0	0.5	21	0	0	0.5	21	0
22	21	21	21	21	0	0	0	0	0	0
0	20.5	0	0	0.5	21	21	0	0.5	0	0
22	20.5	21	0	20.5	0	0	21	20.5	0	0

mol g21 h21

Completando la multiplicación de matrices se obtiene:

$$\mathbf{v}_c = \begin{bmatrix} 0.01 \\ 0.0049 \\ 0.0110 \\ 0.0041 \\ 0.0021 \\ 0.0131 \\ 0.0221 \\ 0.0110 \\ 0.0021 \\ 0.0131 \end{bmatrix} \text{mol g}^{-1}\ \text{h}^{-1} = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ r_C \\ r_A \\ r_E \end{bmatrix}$$

Todos los flujos internos y externos se conocen ahora en unidades de mol g^{-1} h^{-1}. Para convertir a C-mol g^{-1} h^{-1}, cada resultado excepto v_7 se multiplica por el número de átomos de C en la molécula del compuesto al que se refiere el flujo:

glucosa = 6
piruvato = 3
lactato = 3
CO_2 = 1
formiato = 1
acetil CoA = 2
acetato = 2
etanol = 2

El número de átomos de C en el acetil CoA se toma como dos, ya que el carbono de la glucosa se distribuye sólo al grupo acetilo, actuando el CoA como cofactor conservado. Los resultados son:

$$\begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ r_G \\ r_L \\ r_C \\ r_F \\ r_A \\ r_E \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.06 \\ 0.015 \\ 0.033 \\ 0.012 \\ 0.004 \\ 0.026 \\ 0.06 \\ 0.015 \\ 0.011 \\ 0.004 \\ 0.004 \\ 0.026 \end{bmatrix} \text{C-mol g}^{-1}\ \text{h}^{-1}$$

Como el ATP no es un componente del balance de carbono, la tasa de conversión de ATP en ADP, v_7, se expresa en unidades de mol g h^{-1-1} en lugar de C-mol g^{-1} h^{-1}. Los resultados se muestran en la Figura 12.32.

(c) La relación de división del flujo en piruvato para la producción de lactato es:

$$\Phi_L = \frac{\text{flujo a lactato}}{\text{flujo a lactato} + \text{flujo a acetil CoA}} = \frac{0.015}{0.015 + 0.033 + 0.012} = 0.25$$

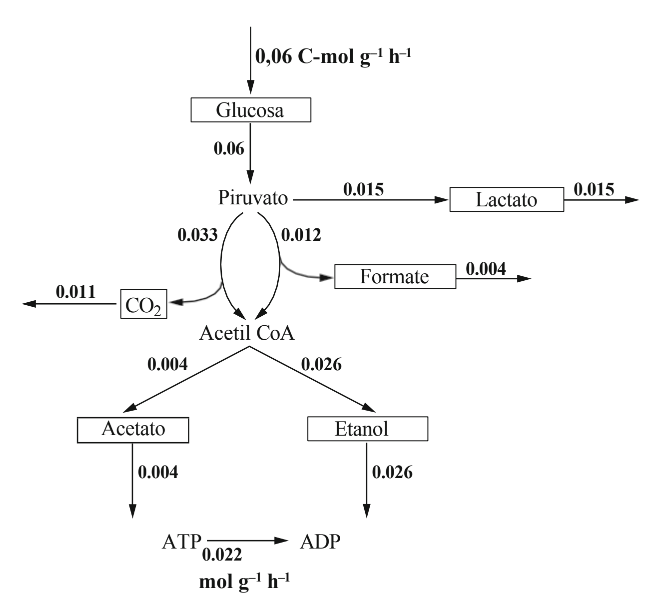


FIGURA 12.32 Ruta metabólica simplificada para la fermentación de ácidos mixtos mostrando los flujos de carbono en mol g de C21 h21 y el flujo de ATP en mol g21 h21 .

(d) La relación de división del flujo en acetil CoA es:

$$\Phi_A 5 \frac{\text{fundente al acetato}}{\text{fundente a acetato 1 fundente a etanol}} 5 \frac{0.004}{0.004\ 1\ 0.026}$$ 5 0,13 para la producción de acetato

$$\Phi_E 5 \frac{\text{flujo a etanol}}{\text{fundente a acetato 1 fundente a etanol}} 5 \frac{0.026}{0.004\ 1\ 0.026}$$ 5 0,87 para la producción de etanol

(e) A partir de la Ec. (12.110), el rendimiento observado de etanol a partir de glucosa es:

$$Y_{PS} 5 \frac{r_E}{r_G} 5 \frac{0{,}0131\ \text{mol g}^{21}\ \text{h}^{21}}{0{,}01\ \text{mol g}^{21}\ \text{h}^{21}} 5 1{,}3\ \text{mol mol}^{21}$$

(f) La tasa de generación de ATP en la vía es igual a la tasa de consumo de ATP para crecimiento 5 v_7 5 0,022 mol g21 h21 .

El ejemplo 12.10 muestra cómo se puede realizar un análisis de flujo metabólico completo en una red estequiométrica determinada con exactitud. Sin embargo, es raro y generalmente poco deseable que los análisis de flujo se lleven a cabo utilizando ecuaciones de balance de masa y sólo suficientes datos medidos para dar una solución única. Esto se debe a dos razones principales.

1. Para la mayoría de las redes metabólicas, el número de metabolitos M es sustancialmente menor que el número de reacciones R, *de* modo que, a partir de la Ecuación (12.133), el sistema está subdeterminado. El número de flujos que pueden encontrarse midiendo las tasas externas de absorción de sustratos y excreción de productos es limitado y a menudo insuficiente para llevar una red metabólica extensa a un estado determinado. Se necesitan otros enfoques y métodos para analizar el sistema.

2. Los resultados del análisis de flujos deben contrastarse con datos experimentales independientes adicionales a los utilizados como restricciones en el análisis. En otras palabras, se requiere un sistema sobredeterminado en el que haya más mediciones que grados de libertad para permitir la validación del modelo de red.

Ambas cuestiones se abordan en las secciones siguientes.

Restricciones adicionales y funciones objetivo

La mayoría de los modelos de red definidos para el análisis de flujos metabólicos están subdeterminados. En estas circunstancias, no se puede encontrar una solución única para la distribución del flujo, sino que existe un número infinito de soluciones que satisfacen todas las ecuaciones de equilibrio disponibles. Se necesitan restricciones adicionales para reducir el tamaño del espacio de soluciones y avanzar en el análisis. Estas limitaciones restringen los valores de los flujos dentro de unos límites prescritos, de modo que puedan encontrarse soluciones realistas que reflejen las propiedades biológicas reales del sistema.

Cuando se calculan los flujos metabólicos, un valor positivo de v indica que la reacción se produce en dirección directa, mientras que un valor negativo indica que la reacción se produce en dirección inversa. Para las reacciones reversibles, tanto los valores positivos como los negativos pueden ser aceptables, ya que tanto las reacciones hacia delante como hacia atrás son posibles termodinámicamente. En este sentido, v para reacciones reversibles no tiene restricciones:

$$-\infty \le v \le \infty \qquad (12.149)$$

En cambio, se sabe que muchas reacciones metabólicas son irreversibles, por lo que se pueden imponer *restricciones termodinámicas* en cuanto a la dirección de la reacción y, por tanto, al valor de v. Por ejemplo:

$$0 \le v \le \infty \qquad (12.150)$$

puede aplicarse como una restricción para una reacción irreversible que sólo puede proceder en la dirección hacia adelante, mientras que:

$$-\infty \le v \le 0 \qquad (12.151)$$

es válida para una reacción irreversible que sólo puede proceder en sentido inverso. Estas restricciones garantizan que las reacciones y las vías cíclicas incluidas en el modelo sean viables desde el punto de vista termodinámico. Si, por ejemplo, se conoce un límite máximo de v, se imponen restricciones adicionales *de capacidad* que reflejen restricciones en la función de la enzima o de la célula:

$$0 \le v \le v_{max} \qquad (12.152)$$

También pueden aplicarse otras *restricciones reguladoras* relacionadas con la expresión génica. Por ejemplo, los flujos de ciertas reacciones metabólicas pueden fijarse en cero basándose en datos transcripcionales si el gen que codifica la enzima responsable se encuentra inactivo.

Incluso después de incluir esas restricciones en el modelo, los sistemas metabólicos suelen seguir estando indeterminados. Sin embargo, se puede encontrar cierto tipo de solución identificando una función *objetivo* y resolviendo las ecuaciones mediante

métodos computacionales conocidos como *programación lineal* u *optimización lineal*. Algunos ejemplos de funciones objetivo son el crecimiento celular,